

ACTUALIZACIÓN SOBRE NEOSPOROSIS EN BOVINOS. PRIMERA PARTE

Review: Neosporosis in cattle. Part 1

Bacigalupe DR

Cátedra de Inmunología Veterinaria,
Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.
calle 60 y 118, (1900) La Plata
Cátedra de Inmunología, Facultad de Veterinaria, UCCuyo
dianab@fcv.unlp.edu.ar

Resumen *Se presenta una revisión sobre el protozoo *Neospora caninum*. En la primera parte, se pone énfasis en los signos clínicos que produce en bovinos, el diagnóstico y la importancia económica en la producción de este ganado. En la segunda parte de este trabajo se trata la respuesta inmune provocada por la neosporosis en bovinos y las medidas de control y profilaxis que se recomienda tomar para prevenir la infección en esta especie.*

Abstract *Neospora caninum infection is a major cause of abortion in cattle. The objective of this work is to review the clinical signs, diagnosis and economic losses produced by neosporosis in cows. The second part of this paper discuss the immune response in cattle and the control and prophylaxis recommended to prevent the infection in this species.*

Palabras clave *Neospora caninum, aborto bovino, apicomplexa, inmunidad*

Key Words *Neospora caninum, bovine abortion, apicomplexa, immunity*

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un parásito protozoo del Phylum Apicomplexa que causa principalmente abortos en bovinos y signos neurológicos en perros. Fue aislado por primera vez en 1988 a partir de tejidos de cachorros de perros por Dubey y col. (28). En el año 2001, en Argentina, Basso y col. realizaron el primer hallazgo a nivel mundial de ooquistes de *N. caninum* en materia fecal de caninos infectados naturalmente, denominando a la cepa aislada NC-6 Argentina (9).

Numerosos trabajos realizados en todo el mundo informan sobre la prevalencia de esta parasitosis en bovinos de los diferentes países, y su asociación con abortos y otras pérdidas económicas (19, 22, 24, 25, 48, 53). En Argentina, Venturini y col. en 1999 hallaron una prevalencia serológica de 64,5 % en vacas de tambo con antecedentes de abortos, y de 24,4 % en fetos de frigorífico, utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (53). Moore y col., en el año 2002, hallaron una prevalencia serológica de 16,6 % en vacas de tambo sin problemas de abortos utilizando la técnica de IFI con diluciones de los sueros de 1: 200 (43). En Inglaterra se estimó la seroprevalencia del 6 % en ganado lechero (20), similar a la hallada en Nueva Zelanda (48). En un estudio en ganado de carne en Canadá se detectó una seroprevalencia del 30 % (58). En EE.UU. se observó una variabilidad del 2 al 98 %, según los diferentes establecimientos estudiados (2).

CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de *N. caninum* es de tipo heteroxeno. Los hospedadores definitivos reconocidos hasta el momento son los perros (*Canis familiaris*) y los coyotes (*Canis latrans*) (9, 32, 42). Los bovinos son hospedadores intermediarios del parásito, en los que puede causar abortos y otras pérdidas económicas. También se ha asociado esporádicamente este protozoo con enfermedades en otras especies domésticas, como ovinos (29), cabras (7) y caballos (41), todos ellos actuando como hospedadores intermediarios. Se encontró evidencia de infección natural, además, en ciervos, rinocerontes, búfalos, camellos, coyotes, liebres, zorros y mapaches. Experimentalmente se han podido infectar ratones, ratas, perros, zorros, cabras, gatos, ovejas, coyotes, cerdos, meriones, conejos, primates no humanos y bovinos (26, 30).

N. caninum puede ser transmitido a través de la placenta en los hospedadores, tanto definitivos como intermediarios (26).

Se conocen tres estados del parásito: los

taquizoítos, los bradizoítos y los esporozoítos. Los taquizoítos y los bradizoítos se encuentran en los tejidos de los hospedadores, tanto intermediarios como definitivos, mientras que los esporozoítos se ubican dentro de los ooquistes eliminados en las heces por los hospedadores definitivos, que esporulan en el medio ambiente. Los quistes tisulares, dentro de los cuales se dividen lentamente los bradizoítos, se hallan en diferentes tejidos, principalmente en el cerebro y la médula espinal, así como en músculo esquelético.

Los hospedadores definitivos pueden adquirir la infección por la ingestión de tejidos que contengan quistes tisulares de *N. caninum* y por la vía transplacentaria, manifestándose la enfermedad con una amplia variedad de signos, principalmente neurológicos (4, 17, 23, 39). En los bovinos, *N. caninum* puede transmitirse por vía horizontal (post-natal) o por vía vertical (transplacentaria). La vía horizontal ocurre cuando el ganado ingiere ooquistes esporulados (9, 21, 42) y la vía vertical se produce por la transmisión transplacentaria de los taquizoítos desde la madre hacia el feto (20, 47), la cual es altamente eficiente (Figura 1). La transmisión horizontal entre bovinos no ha sido demostrada, como así tampoco la transmisión venérea (27).

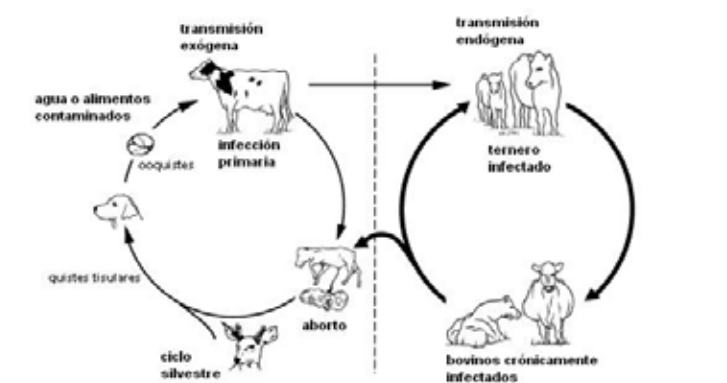
NEOSPOROSIS EN BOVINOS

En los bovinos la neosporosis raramente se asocia con signos clínicos, siendo el más común la presencia de abortos, más frecuentes entre el 5° y el 8° mes de gestación, principalmente en bovinos de tambo (3, 8, 25, 33, 50, 51, 53). Los fetos de menor edad pueden presentarse momificados y ser retenidos en el útero, y aquéllos más pequeños pueden ser reabsorbidos y como consecuencia de ello, las madres retornan al ciclo (27). También puede ocurrir el nacimiento de terneros débiles que mueren poco tiempo después del parto. Las terneras clínicamente sanas pero infectadas transplacentariamente podrán transmitir a sus crías la infección por vía vertical durante preñeces consecutivas, por lo que la infección puede permanecer por años en un rodeo sin necesidad de un hospedador definitivo (34, 37).

En terneros infectados transplacentariamente se pueden observar signos de daño neurológico, dificultad para caminar y bajo peso (25, 30). Las extremidades pueden estar flexionadas o hiperextendidas, con ataxia y pérdida de reflejos y de la propiocepción. Ocasionalmente pueden presentarse defectos como hidrocefalia y exoftalmia (25).

Se han descrito dos patrones en la aparición de abortos por neosporosis en bovinos: endémicos y

Figura 1: Transmisión de neosporosis en bovinos. (Adaptado de 27).



epidémicos. En los endémicos se presenta una tasa de abortos mayor al 5 % por año y es persistente a través del tiempo, en los epidémicos ocurre una alta proporción de abortos, hasta del 30 % (50), en un breve período de tiempo (2), asociados a una primoinfección (44, 45).

Otro factor a tener en cuenta en el caso de infecciones transplacentarias es la inmunocompetencia del feto (37). Alrededor de la mitad de la gestación el feto es capaz de desarrollar una respuesta inmune específica para *N. caninum* con la producción de IFN γ y otras citoquinas (1) que pueden influir en la relación parásito- hospedador y en la resolución de la enfermedad (38).

N. caninum es considerado un patógeno primario en bovinos. La lesión característica que se observa es encefalitis multifocal caracterizada por necrosis e inflamación no supurativa, en algunos casos con la presencia de los parásitos. En la placenta la multiplicación de *N. caninum* causa destrucción focal e inflamación no supurativa, con necrosis de las vellosidades. Los fetos abortados presentan focos de necrosis e infiltraciones multifocales en muchos tejidos, incluyendo corazón, músculo esquelético, pulmón e hígado. En terneros que nacieron enfermos la principal lesión que se ha observado ha sido encefalomielitis, con gliosis y manguitos perivasculares y la presencia de quistes o taquizoítos. También pueden observarse lesiones en el miocardio (27).

NEOSPOROSIS EN BOVINOS DE ARGENTINA

La presencia de *N. caninum* en nuestro país fue informada por primera vez por Venturini y col. en el año 1995, a través de la detección de anticuerpos

en vacas que habían abortado mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (57). En 1998 Campero y col. identificaron quistes tisulares en el cerebro de fetos bovinos abortados con la técnica de inmunohistoquímica (16).

En el año 1999 Venturini y col. informaron una prevalencia serológica de 64,5 % en hembras bovinas con antecedentes de abortos provenientes de tambos de las provincias de Buenos Aires y sur de Santa Fe. En ese estudio se utilizó la prueba de IFI con títulos $\geq 1:25$. En fetos de vacas Holando Argentino de faena se obtuvo una seroprevalencia de 24,4 % (título IFI $\geq 1:80$), mientras que en fetos provenientes de ganado Aberdeen Angus la prevalencia fue de 4,5 %. Mediante histopatología del cerebro de fetos positivos, se observaron lesiones compatibles con neosporosis, quedando de esta manera establecida la presencia de la vía de transmisión transplacentaria en Argentina (53).

El primer aislamiento de *N. caninum* a partir de bovinos en el país fue realizado por Venturini y col. en el año 2001, a partir del cerebro de una ternera prematura (55). En el año 2001, Basso y col. aislaron por primera vez en Argentina *N. caninum* a partir de ooquistes detectados en heces de un perro infectado naturalmente, denominándose a esta cepa NC-6 Argentina (9).

En un estudio epidemiológico realizado por Moore y col. en el año 2002 mediante la utilización de la prueba de IFI a una dilución de los sueros de 1:200, se detectaron seroprevalencias de 4,7 % en bovinos de cría y 16,6 % en bovinos de tambo sin antecedentes de enfermedad reproductiva, mientras que en vacas que habían abortado las prevalencias fueron de 43,1 % para bovinos de tambo y 18,9 % para bovinos de cría. También hallaron lesiones compatibles con neosporosis en fetos y placentas,

confirmando el diagnóstico en 29 de 43 muestras sospechosas (43).

En el año 2009, mediante la utilización de la prueba de IFI a partir de una dilución de 1:25, se halló una prevalencia de neosporosis de 80,9% en bovinos y de 30% en terneros que fueron sangrados previamente a la toma de calostro. Las vacas cuyos títulos de anticuerpos fueron más altos demostraron una mayor frecuencia de transmisión vertical que las que tuvieron títulos más bajos. En este trabajo se estimó una frecuencia de transmisión horizontal de 47 a 51 %, y de transmisión vertical de 37,1 %.(44)

DIAGNÓSTICO

La detección de anticuerpos para *N. caninum* en los animales sospechosos indica la exposición al parásito. La técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue la primera prueba inmunoserológica usada para la detección de anticuerpos anti- *N. caninum* y se la ha utilizado como prueba de referencia para el desarrollo de otras técnicas (14, 31). Se considera que es adecuada para detectar infección en los animales y para caracterizar epidemiológicamente el rodeo de acuerdo a los valores de los títulos. Además de la prueba de IFI (6, 18, 30, 46, 57), se han desarrollado diversos tipos de ELISA, algunos comerciales (11, 12, 14, 31) y existe una prueba de Aglutinación directa con antígeno formolado (14, 45, 49). Diversos autores han comunicado el desarrollo de pruebas de Western blot, con diferentes preparaciones antigénicas (13, 31, 35).

El examen histológico e inmunohistoquímico de los órganos de los fetos abortados es necesario para un diagnóstico definitivo de neosporosis (16, 26). El aislamiento a partir de la inoculación de cerebros de fetos abortados o de terneros infectados en ratones o meriones también puede utilizarse con fines de diagnóstico, aunque es de baja sensibilidad ya que el tejido inoculado en general está autolizado y por lo tanto los parásitos tienen poca viabilidad (31, 40, 54).

La prueba de PCR juega un rol importante en el diagnóstico y la investigación de *N. caninum* (31, 36). Basso y col. demostraron la utilidad de esta prueba para el diagnóstico etiológico en casos de abortos bovinos, en los cuales el aislamiento del protozoo es muy difícil y la serología negativa no es confirmatoria (10). Se ha utilizado esta técnica para identificar el ADN de *N. caninum* en muestras de tejidos fetales, líquido amniótico, ooquistes en heces de perros y coyotes, tejidos de hospedadores intermediarios, sangre, leche y semen (31).

IMPORTANCIA ECONÓMICA

El efecto más importante de la neosporosis en los bovinos es la producción de abortos, con las consecuentes pérdidas económicas que ello ocasiona a los productores. Sin embargo, existen otras pérdidas que no son tan visibles, pero que tienen un impacto real en la economía, como por ejemplo la reabsorción embrionaria, infertilidad, muerte perinatal y descarte prematuro de animales seropositivos por bajo rendimiento en los rodeos. A estas pérdidas hay que sumarle los costos ocasionados por la asistencia profesional, el diagnóstico, la disminución en la producción láctea y el costo del reemplazo de las vacas abortadas (24, 37, 51, 52).

Se ha comprobado la asociación entre seropositividad a *N. caninum* y menor ganancia diaria de peso (5, 56). En Argentina, en un estudio realizado en terneros de feed- lot, los animales negativos tuvieron una ganancia de peso significativamente mayor que los animales positivos (56).

Las pérdidas económicas estimadas en California relacionadas con los abortos por *N. caninum* alcanzarían aproximadamente 35 millones de dólares estadounidenses por año, y se calcula que aproximadamente 40.000 abortos anuales podrían estar asociados a neosporosis. En Australia y Nueva Zelanda, se estima que las pérdidas ocasionadas por la neosporosis superan los 100 millones de dólares australianos anuales (48). Entre el 20 y 30 % de los abortos bovinos ocurridos en California se deberían a esta parasitosis, (2) como así también alrededor del 12,5% de los producidos en Bélgica (22) y el Reino Unido (19).

En Argentina, en el año 2002 se estimó que las pérdidas en rodeos lecheros eran de 80 millones de dólares por año considerando la seroprevalencia en estos rodeos, el costo por los abortos, la menor producción láctea y la eliminación de animales seropositivos (15).

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Almeria S, De Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP Gasbarre LC. Cytokine gene expression in dams and foetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. Parasite Immunol. 2003; 25: 383- 392.
- 2- Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. Neosporosis in cattle. Anim. Reprod. Sci. 2000; 60- 61: 417- 431.
- 3- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. Neospora like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 1991; 198: 241-244.

- 4- Barber JS, Trees AJ. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet Record*. 1996; 139: 439-443.
- 5- Barling KS, Mc Neill JW, Thompson JA, Paschal JC, Mc Collum FT, Craig TM, Adams LG. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J Am Vet Med Assoc*. 2000; 217: 1356-1360.
- 6- Barr BC, Anderson ML, Sverlow KW, Conrad PA. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet Record* 1995; 137: 611- 613
- 7- Barr BC, Anderson ML, Woods LW, Dubey JP, Conrad PA. *Neospora*- like protozoan infections associated with abortion in goats. *J Vet Diagn Invest*. 1992; 4: 365- 367.
- 8- Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, BonDurant RH, Ardans AA, Oliver MN, Conrad PA. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J Vet Diagn Invest*. 1994; 6: 207- 215.
- 9- Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OCH, Shen SK, Dubey JP. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol*. 2001; 87 (3): 612- 618.
- 10- Basso W, Venturini MC, Moré G, Quiroga MA, Travería G, Bacigalupe D, Kienast M, Venturini L. Aplicación de PCR para la detección de *Neospora caninum* en fetos bovinos abortados mediante la técnica de PCR. 12° Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario. Montevideo, Uruguay, 2005.
- 11- Baszler TV, Adams S, Vander-Schalie J, Mathison BA, Kostovic M. Validation of a commercially available monoclonal antibody- based competitive- inhibition enzyme- linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 3851- 3857.
- 12- Baszler T., Knowles D., Dubey J.P., Gay J., Mathison B., McElwain T. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 1423- 1428
- 13- Bjerkås I, Jenkins M, Dubey JP. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of Neosporosis. *Clin Diag Lab Immunol*. 1994; 1: 214- 221.
- 14- Björkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol*. 1999; 29: 1497-1507.
- 15- Campero CM. Pérdidas provocadas por *Neospora caninum* en bovinos. En: reunión de Especialistas en Parasitología Veterinaria de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay- 11° Encuentro de Veterinarios Endoparasitólogos Rioplatenses. FAO- AAPA- VET, UNCPBA. Tandil; 2002.
- 16- Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA. *Neospora caninum*- associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet Record* 1998; 143: 228- 229.
- 17- Castellano MC, Basso W, Venturini L, Venturini MC, Bacigalupe D, Unzaga JM. *Neosporosis canina*. Descripción de un caso. *Selecciones Veterinarias* 1999; 7 (3): 244-246.
- 18- Conrad PA, Sverlow KW, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G., Breitmeyer R., Palmer C., Thurmond M., Ardans A., Dubey J.P., Duhamel G., Barr B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J. Vet. Diagn. Invest*. 1993; 5: 572- 578
- 19- Davison, H. C.; Otter, A., Trees A.J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int. J. Parasitol*. 1999; 29: 1189-1194.
- 20- Davison H.C., Otter A., Trees A.J. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infection in dairy cattle. *Int. J. Parasitol*. 1999; 29: 1683- 1689.
- 21- De Marez T., Liddell S., Dubey J.P., Jenkins M.C., Gasbarre L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol*. 1999; 29: 1647- 1657.
- 22- De Meerschman F., Speybroeck N., Berkvens D., Rettignera C., Focant C. , Leclipteux T., Cassart D., Losson B. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in elgium. *Therigenology* 2002; 58: 933-945.
- 23- Dijkstra T., Eysker M., Schares G., Conraths F. J., Wouda W., Barkema H. W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol*. 2001; 31 (8): 747- 752.
- 24- Dubey, J. P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 1999; 214 (8): 1160-1163.
- 25- Dubey, J. P. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol*. 2003; 89 (Supl.): S42-S56.
- 26- Dubey J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol*. 2003; 60: 1- 16.
- 27- Dubey J.P., Buxton D., Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol*. 2006; 134 (4): 267- 289.
- 28- Dubey J. P., Hattel A. L., Lindsay D. S., Topper M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 1988; 193: 1259-1263.
- 29- Dubey J.P., Lindsay D.S. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest*. 1990; 2: 230- 233.
- 30- Dubey J.P., Lindsay D.S., Adams D.S., Gay J.M., Baszler T.V., Blagburn B.L., Thulliez P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res*. 1996; 57: 329-336.
- 31- Dubey J.P., Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol*. 2006; 31;140 (1-2): 1- 34.
- 32- Gondim L.F., McAllister M.M., Pitt W.C., Zemlicka D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol*. 2004; 34: 159- 161.
- 33- Gottstein B., Hentrich R., Wyss B., Thür A., Busato A., Stärk K.D.C., Müller N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol*. 1998; 28: 679- 691.
- 34- Hall C.A., Reichel M.P., Ellis J.T. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet. Parasitol*. 2005; 128: 231- 241.
- 35- Hemphill A., Gottstein B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol. Res*. 1996;

82: 497-504.

36- Ho M.S.Y., Barr B.C., Marsh A., Anderson M., Rowe J., Tarantal A., Hendrickx A., Sverlow K., Dubey J.P., Conrad P. Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR Amplification and Specific Small-Subunit rRNA Sequence Probe Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 34: 1203- 1208.

37- Innes E.A., Andrianarivo A.G., Björkman C., Williams D.J.L., Conrad P.A. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitol.* 2002; 18 (11): 497- 504.

38- Innes E.A., Wright S., Bartley P., Maley S., Macaldowie C., Esteban- Redondo I., Buxton D. The host- parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005; 108 (1-2): 29- 36.

39- Lindsay D. S., Dubey J. P. Canine neosporosis. *J. Vet. Parasitol.* 2000; 14: 1- 11.

40- Lindsay D.S., Lenz S.D., Cole R.A., Dubey J.P., Blagburn B.L. Mouse Model for Central Nervous-System *Neospora caninum* Infections. *J. Parasitol.* 1995; 81: 313- 315

41- Marsh A.E., Barr M.C., Madigan J., Lakritz J., Nordhausen R., Conrad P.A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1996; 209: 1907- 1913.

42- Mc Allister M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A., Mc Guire A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 1998; 28: 1473- 1478.

43- Moore D. P., Campero C. M., Odeon A. C., Posso M. A., Cano D.R., Leunda M., Basso W., Venturini M. C., Spath E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet. Parasitol.* 2002; 107: 303-316.

44- More G., Bacigalupe D., Basso W., Rambeaud M., Beltrame F., Ramirez B., Venturini M.C., Venturini L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet. Parasitol.* 2009; 160: 51-54.

45- Packham A., Sverlow K., Conrad P., Loomis E., Rowe J., Anderson M., Marsh A., Cray C., Barr B. A. Modified Agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998; 5 (4): 467- 473

46- Pare J., Hietala S.K., Thurmond M.C. Interpretation of an indirect fluorescent-antibody test for diagnosis of *Neospora* sp infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1995; 7: 273-275.

47- Pare J., Thurmond M.C., Hietala S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 1996 ;60 (2): 133- 139.

48- Reichel, M. P. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. *Aust. Vet. J.* 2000; 78: 258-261.

49- Romand S., Thulliez P., Dubey J.P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.* 1998; 80: 54- 56.

50- Thilsted J.P., Dubey J.P. Neosporosis-like abortion in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1989; 1: 205-209.

51- Thurmond M.C., Hietala S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*

1996; 57: 1559- 1562

52- Thurmond M.C., Hietala S.K. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first- lactation dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1997; 210: 672- 674.

53- Venturini M.C., Venturini L., Bacigalupe D., Machuca M., Echaide I., Basso W., Unzaga J. M., Di Lorenzo C., Guglielmone A., Jenkins M.C., Dubey J.P. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 1999; 29: 1705- 1708.

54- Venturini M.C., Bacigalupe D., Venturini L., Rambeaud M., Campero C., Moore D., Unzaga J.M., Basso W., Machuca M. Detección de *Neospora caninum* en ratones inoculados con cerebros de fetos bovinos abortados. En: *Memorias del XXI Congreso Mundial de Buiatría. Uruguay; 2000. p. 95*

55- Venturini M.C., Bacigalupe D., Venturini L., Basso W., Moore P., Unzaga J.M., Machuca M., Campero C. Isolation of *Neospora* sp. from the brain of a dairy calf in Argentina. En: *Resúmenes de 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP. 23- 26 de agosto de 2001. Stressa, Italia; 2001. p. 20.*

56- Venturini L., Boero C., Basso W., Venturini C., Moreno H... Neosporosis en terneros de un feed-lot: su evolución y efectos asociados en la ganancia de peso. En: *Resúmenes de la XVI^a Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico. 13-15 Noviembre de 2002. Córdoba, Argentina; 2002. p. E-16.*

57- Venturini L., Di Lorenzo C., Venturini C., Romero J. Anticuerpos anti *Neospora* sp. en vacas que abortaron. *Vet. Arg. XII* 1995; 113: 167- 170.

58- Waldner C.L., Janzen E.D., Ribble C.S. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998; 213 (5): 685- 690.